



本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

0901088
09/897,107

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 5月31日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-164332

出 願 人

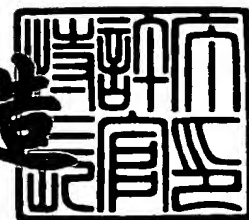
Applicant(s):

味の素株式会社

2001年 6月28日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3061042

【書類名】 特許願

【整理番号】 Y1I0476

【提出日】 平成13年 5月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都板橋区大山東町 5 - 2 - 7 0 4

 【氏名】 山岸 明彦

【特許出願人】

 【識別番号】 000000066

 【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100059959

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 中村 稔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100067013

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 大塚 文昭

【選任した代理人】

 【識別番号】 100082005

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 熊倉 禎男

【選任した代理人】

 【識別番号】 100065189

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 宍戸 嘉一

【選任した代理人】

 【識別番号】 100096194

 【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100086771

【弁理士】

【氏名又は名称】 西島 孝喜

【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-201920

【出願日】 平成12年 7月 4日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

特 2001-164332

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9911474

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質の耐熱性を向上させる方法、該方法により耐熱性の向上したタンパク質、および該タンパク質をコードする核酸

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (i) 系統樹中の複数の生物種に由来する、進化的に互いに対応するタンパク質のアミノ酸配列を比較すること、
(ii) (i) で比較したアミノ酸配列に対応する、祖先型タンパク質のアミノ酸配列を推定すること、
(iii) (i) で比較したタンパク質の 1 つにおいて、そのアミノ酸配列中のアミノ酸残基を (ii) で推定した祖先型タンパク質中の対応する位置のアミノ酸残基と比較し、前記祖先型と異なるアミノ酸残基の 1 以上を前記祖先型タンパク質と同一のアミノ酸残基に置換すること、
を含む、タンパク質の耐熱性を改善する方法。

【請求項 2】 更に、(iv) アミノ酸が置換されたタンパク質の耐熱性を試験すること、
(v) 耐熱性の向上したタンパク質を選抜すること、
を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のタンパク質の耐熱性を改善する方法であって、

(a) (i) において比較するタンパク質が由来する生物種に好熱菌または古細菌が含まれること、または、

(b) (i) において比較するタンパク質に同一ファミリーに属する複数のタンパク質が含まれること、
を特徴とする、前記方法。

【請求項 4】 請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法によって耐熱性が改善されたタンパク質。

【請求項 5】 請求項 4 に記載のタンパク質をコードする核酸。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の核酸を発現可能な形で含む組換え DNA 分子

【請求項 7】 請求項 6 に記載の組換え DNA 分子を有する宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、タンパク質の耐熱性を向上させる方法に関する。また、本発明は、耐熱性の向上したタンパク質、耐熱性の向上したタンパク質をコードする核酸に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

高温で活性を有するタンパク質、特に耐熱性の酵素は、作用させるときに冷却する必要がないなど、高温で失活する他のタンパク質に比較して有利な点を有する。通常、そのようなタンパク質は、好熱菌と称される高温下に生育できる細菌によって産生されることが多い。従って、耐熱性タンパク質を設計する場合には、そのような一群の好熱菌の対応するタンパク質のアミノ酸配列を解析し、それらに共通して見られるアミノ酸配列上の特徴を参考にして設計されることが多い。あるいは、好熱菌の産生するタンパク質の立体構造を解析し、その情報に基づいて耐熱性を付与している構造を推定し、そのような構造をとり得るように非耐熱性タンパク質の構造を改変する等の手法がとられている。好熱菌タンパク質の例としては、例えば *leuB* によってコードされる 3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (IPMDH) が知られており、*Thermus thermophilus* HB8 の IPMDH についてはその立体構造が明らかにされている (K. Imada ら、J. Mol. Biol. 222, 725-738, 1991)。また、IPMDH と類似の触媒機構、アミノ酸配列、立体構造を有するタンパク質、すなわち同一ファミリーに属するタンパク質として、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICDH) が知られている。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、タンパク質の耐熱性を改善する方法、および耐熱性の改善されたタンパク質およびそのタンパク質をコードする核酸、および、耐熱性の改善されたタンパク質を産生する宿主細胞を提供することである。

特に、本発明の目的はタンパク質の1次構造の情報のみを利用して、タンパク質の耐熱性を改善する方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ウーズ(Woese)らによって示された16srRNAによる系統樹(図1)を見ると、80℃以上で至適に生育する生物が根元に多いことが示されているという事実から、真正細菌、真核生物、古細菌の共通の祖先は超好熱菌ではないかと考え、現在見られる多くの好熱菌のタンパク質は必ずしも真の祖先型ではないが、真の祖先型のアミノ酸配列を有する、またはそれに近づいた配列を有するタンパク質は更に耐熱性が向上しているであろうと考えるに至った。そこで、出願人は、耐熱性のタンパク質を設計、製造するためには、好熱菌のタンパク質の配列および高次構造のみを解析してこれを模倣するよりも、祖先型タンパク質のアミノ酸配列を推定してこれを模倣することがより重要である、との考えに基づいて本発明を完成させた。

【0005】

即ち、本発明は、

- (i) 系統樹中の複数の生物種に由来する、進化的に互いに対応するタンパク質のアミノ酸配列を比較すること、
 - (ii) (i) で比較したアミノ酸配列に対応する、祖先型タンパク質のアミノ酸配列を推定すること、
 - (iii) (i)で比較したタンパク質の1つにおいて、そのアミノ酸配列中のアミノ酸残基を(ii)で推定した祖先型タンパク質中の対応する位置のアミノ酸残基と比較し、前記祖先型と異なるアミノ酸残基の1以上を前記祖先型タンパク質と同一のアミノ酸残基に置換すること、
- を含む、タンパク質の耐熱性を改善する方法である。

特に、本発明は好熱菌または古細菌と系統樹中で進化的に近い生物種を、対応するタンパク質のアミノ酸配列に関して比較することを含む。

また、本発明はそのような方法によって、耐熱性の向上した酵素、その酵素をコードする核酸、および、そのような核酸を含む宿主細胞である。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明においては、生物種の分子レベルの情報に基づく分子系統樹（以下、単に系統樹という）、または系統樹作成のためのアルゴリズムが利用される。系統樹の作製のためのいくつかのアルゴリズム、例えば、最大節約原理に基づくアルゴリズム等が知られており、それを実現するコンピュータプログラムも利用あるいは入手することができる。例えば、CLUSTALW、PUZZLE、MOLPHY、PHYLIP等の種々の系統樹推定プログラムが利用できる。それらを用いて系統樹を作製することができるが、より簡便には、既に公表されている系統樹を利用することもできる（図1）。例えば、ウーズらによって提唱された16S rRNAのデータに基づく系統樹を利用することができる。このような系統樹においては、分子進化的に近い位置の生物種は、系統樹中で近い位置に現れる。また、系統樹中で根元に近い位置にある生物種はより祖先に近いと考えられる。

【0007】

本発明の目的には、比較的根元に近い部分の系統樹を利用することが好ましく、トリあるいは偶蹄類よりも古い部分を利用することがより好ましく、好熱菌または古細菌を含む系統樹部分を利用するのが特に好ましい。なぜならば、好熱菌および古細菌は系統樹中、かなり根元付近、すなわち進化的に祖先に近いところに位置し、その産生するタンパク質は祖先型の超耐熱性タンパク質に比較的近いと期待されるからである。あるいは、どのような種のもので良いが、同一ファミリーに属する別のタンパク質を含むことが好ましい。なぜならば、あるタンパク質を、古細菌のタンパク質あるいは同一ファミリーの別のタンパク質と比較することにより、後述する方法により系統樹の根本の祖先型アミノ酸残基（配列）を推定することが可能になるからである。

本明細書において、「好熱菌」とは、好温菌、耐熱菌などとも称され、高温下に生育できる細菌の総称であり、通常約55℃以上で生育できる菌を示す。本発明においては、「好熱菌」とは約75℃以上でも生育する高度好熱菌、約55℃～74℃で生育する中等度好熱菌を含み、更に、常温でも生育できる通性好熱菌および約40℃以上でのみ生育できる絶対好熱菌をも含む。また、「非好熱菌」とは好熱菌

以外の微生物を言う。「古細菌」とは前述のWoeseの分類による古細菌をいい、メタン生成細菌、高度好塩菌、硫黄還元古細菌等を含む原核生物群を言う。古細菌は細胞膜の脂質がエーテル脂質である点で真正細菌と明確に区別し得る。また、本明細書において、「同一ファミリーに属するタンパク質」とは、機能、アミノ酸配列、ドメイン構造、立体構造等のいずれか1以上の点で類似しているタンパク質をいい、これらには、少なくともアミノ酸配列の一部が相同でマルチプルアラインメント可能である一群のタンパク質、特にアミノ酸配列が相同でマルチプルアラインメント可能である一群のタンパク質が含まれる。これらの同一ファミリーに属する複数のタンパク質は同じ祖先型タンパク質に由来することが強く期待される。

【0008】

次に、種々の生物種から、耐熱性を改善しようとする互いに対応するタンパク質のアミノ酸配列の情報を取得、または決定する。本発明が適用され得るタンパク質は特に限定されないが、多くの生物種にわたって存在するタンパク質が好ましく、特に産業上の利用価値の高い酵素が好ましい。例えば、好熱菌が産生するタンパク質、特に耐熱性の酵素が好ましい。そのような例として、本発明の実施例に記載したスルフォロブスsp.7株(*Sulfolobus* sp. strain 7)のIPMDH、ICDHを挙げることができる。この菌株のIPMDHをコードする遺伝子はSuzukiらによってクローニングされているものである(T. Suzukiら、J. Bacteriol. 179(4), 1174-1179, 1997)。

耐熱性を改善しようとするタンパク質のアミノ酸配列は、既知のデータベースから取得することもできる。新たにアミノ酸配列を決定する場合は、この技術分野で知られた何れのアミノ酸配列決定方法も使用することができる。あるいは、部分アミノ酸配列の情報等を利用してそのタンパク質をコードする核酸を取得し、当業者に広く知られた塩基配列決定方法によってその核酸の配列を決定し、その核酸配列を基にアミノ酸配列を推定してもよい。

【0009】

得られた複数の生物種からのアミノ酸配列をマルチプルアライメント(多重整列)し、それぞれの生物種から取得したアミノ酸配列を比較する。マルチプルア

ラインメントのための方法も幾つか知られている。その多くは、挿入、欠失、置換等による変化量を最小化する最節約原理に基づくものであり、これを実現するコンピュータプログラムも開発され、利用あるいは入手することができる。そのようなプログラムとして例えばTreeAlign等が知られており、DDBJからは、その1990年Versionであるmalignを利用することができる。本発明においては、系統樹中で進化的に近いとされる生物種を選択するため、マルチプルアラインメントには系統情報が既に利用されていることとなり、その結果系統情報を利用しない場合に比較してより適切なアラインメントを行なうことができる。マルチプルアラインメントを行なうためには少なくとも3種の生物種からの情報を利用する。アラインメントに使用するデータの起源の数が多くなるほど適切な情報が得られる。更に、前述した理由により、比較する生物種には1種以上の好熱菌または古細菌が含まれていることが好ましい。あるいはファミリータンパク質、すなわち同一の祖先型タンパク質に由来すると期待される別のタンパク質が含まれていることが好ましい。

【 0 0 1 0 】

アラインメントの結果が得られたならば、系統樹上で祖先型タンパク質のアミノ酸配列を推定することができる。このためには例えば、最大節約法あるいは最尤法を使用することができ、これらの手順は当業者に知られたものである（例えば、Young, Z., Kumar, S. と Nei, M., *Genetics* 141, 1641-1651, 1995、Stewart, C.-B. *Active ancestral molecules*, *Nature* 374, 12-13, 1995、根井正利「分子進化遺伝学」培風館などを参照せよ）。例えば、本発明に使用し得る最大節約法とは、簡単に言うと、祖先型を仮定したときにその後生じると予想される変異の事象の数が最も少ない祖先型の過程を真の祖先型と推定する方法である。あるいは、最大節約法の代わりに最尤法(Maximal likelihood method)を用いることもできる。また、最大節約法に基づいてアミノ酸配列から直接に祖先型推定を行なうためのプログラムPROTPARS (PHYLIPに含まれる) も利用可能である。これらの方法では原理的には系統樹の推定と祖先型アミノ酸の推定が同時に行われるため、これらの方法を使用する場合は必ずしも系統樹を作成することは必要ではないが、特に手動計算で祖先型アミノ酸を推定する場合には系統樹を作成すること

が好ましい。また、前述したような方法、あるいは他の既知の方法に基づいて作成された系統樹、特に、公表された系統樹に基づいて以下のような最大節約法あるいは最尤法を用いた手順により祖先型アミノ酸配列を決定することもできる。

【0011】

最大節約法を用いた手順を、実施例にも記載したIPMDHを例として以下に更に詳細に説明する。

現在までにクローニングされアミノ酸配列が明らかになっているIPMDHおよびICDHの幾つかの生物種由来のアミノ酸配列をマルチプルアラインメントする（図2）。次にこの配列を元に、例えば最大節約法あるいは近隣接合法等を用いて系統樹を作成する（図3）。この時、例えば最大節約法によれば系統樹を作成せずに直接祖先型アミノ酸配列を推定することも可能であることは前述したが、以下では手順を理解しやすくするため、系統樹を明示的に利用する手順を説明する。この手順は既に作成された、例えば公表された既知の系統樹を利用する場合にも適用可能である。

【0012】

いずれかの方法で得られた系統樹を利用してマルチプルアラインメントした残基のそれぞれの部位に関して祖先型アミノ酸を決定することができる。例えば、図4には種々の生物のIPMDHのスルフォロブスsp.7株の152番残基に対応するアミノ酸残基が記載されており、この図中に記載された生物においてはその位置のアミノ酸はR、S、KあるいはEである。ここで、系統樹中近接する種における残基が共にRである場合は、両者の共通の祖先生物種は（系統図中で2つの種を結ぶ枝の結合点で示される）スルフォロブスsp.7株152番位置に対応するアミノ酸残基がRであったと推定することができる。なぜならば、Sが祖先型であるとする、2回以上の変異事象を考慮しなければ、現存する生物種における、スルフォロブスsp.7株152番残基に対応するアミノ酸残基を説明できないのに対し、Rが祖先型であると仮定すれば1回の変異事象で説明がつくからである。

【0013】

2つの種がRとSのように異なった残基を持つ場合は、共通の祖先型を直ちには決定することができない。しかし、この場合であっても、更に一つ深い枝（即ち

、系統樹中で左側にある結合点)ではもう一方の枝がRであれば、共通の祖先をRと推定することができる。このようにして、進化的に遡る、即ち、図中で左側へ進んでいくことにより、図中で最も左側の点に対応するアミノ酸配列が最も祖先型のアミノ酸配列であると推定することができる。図4では、スルフォロブス sp. 7株152番位置に対応する祖先型アミノ酸残基はRであると推定されている。

【0014】

このようにして、マルチプルアラインメントした配列の各々の残基に関して祖先型アミノ酸残基を推定し、その結果、対応する領域の祖先型アミノ酸配列を推定することができる。この場合、祖先型アミノ酸配列を推定するために用いる生物種を変えると、系統樹の樹形が変化し、それと関連して異なる祖先型アミノ酸残基が得られる場合もあり、その位置と種類は比較に用いるタンパク質にも依存する。従って、本発明の目的には、そのような変動が比較的少ない位置のアミノ酸残基を改変の対象とすることが好ましい。そのようなアミノ酸残基は、系統樹の作成に用いる生物種を変える、あるいは、生物種は変えずに系統樹作成に使用するアミノ酸配列情報の一部のみを用いるなど、系統樹の作成に使用するアミノ酸配列情報を変化させた場合の樹形変化の程度を見積り、樹形への影響の少ない残基を選択することによって決定することもできる。

【0015】

以上のような手順を用いることにより、耐熱性を改善しようとするタンパク質について、種々の生物種で互いに対応する領域がある限り、その領域にわたって祖先型アミノ酸配列を推定することが可能である。このようにして決定されたアミノ酸配列中の各アミノ酸残基は、実際には、現存する生物種、特にそれが好熱菌あるいは古細菌であれば、これらの生物種は進化的にかなり古いため、その有するタンパク質のアミノ酸配列中のアミノ酸残基と多くの位置において一致するであろう。従って、本発明においては、このような場合には推定された祖先型タンパク質のアミノ酸配列と異なるアミノ酸残基のみ改変すればよい。

【0016】

前述した手順に従って、祖先生物種のタンパク質のアミノ酸配列を推定する際に、比較する生物種の中に好熱菌、非好熱菌が混在していたとしても、あるいは

、好熱菌のみが比較する他の生物種と異なるアミノ酸残基を有している場合であっても、それらの事実に影響されることなく、前述した手順に従って祖先型を決定することができる。他と相違するアミノ酸配列を有するタンパク質を有する生物種が多数あって、それらの情報のみで祖先型が推定できない、あるいは確度が低いと考えられる場合には、更にアライメントに使用するデータを追加することができる。その結果、祖先型アミノ酸残基が決定できるようならば、そのアミノ酸残基を祖先型として採用することができる。

一般には、そのようなアミノ酸残基が存在する位置および領域は、タンパク質中で複数存在するであろう。それらの領域または位置は離れている場合も、近接している場合もあるであろう。それらの位置およびアミノ酸残基の全てを後述する改変のために記録する。

【0017】

上述のようにして、各位置のアミノ酸残基について祖先型アミノ酸残基が決定されたならば、解析対象としたタンパク質について非祖先型であるアミノ酸残基の少なくとも1つを祖先型アミノ酸残基に置換してそのタンパク質を改変する。この場合、置換するアミノ酸残基の数および位置は改変すべきタンパク質、必要とする耐熱性、および所望の比活性に応じて変動させることができる。好ましくは十分な耐熱性を有すると同時に高い比活性を有するように置換すべき位置と数を選択される。十分な耐熱性と高い比活性を同時に実現するためには、一般には、活性中心の位置および活性中心周辺のアミノ酸配列等の更なる情報が利用される。

改変すべきタンパク質は、比較したどの生物種に由来してもよいが、最も耐熱性の高い生物種に由来するタンパク質を選択することが好ましい。特に、好熱菌の産生するタンパク質を改変すべきタンパク質として選択することが好ましい。なぜならば、耐熱性の高い生物種に由来するタンパク質は一般には耐熱性が高いことが期待され、既にある程度の耐熱性を有するであろうタンパク質をより完全な祖先型タンパク質に改変することによって、さらなる耐熱性の向上が期待できるからである。タンパク質中のアミノ酸残基の置換は、そのタンパク質をコードする核酸を改変することによって行なうことができる。簡単に言えば、アミノ酸

残基を置換しようとするタンパク質をコードする遺伝子を取得し、目的とする部位のアミノ酸残基が置換されるようなプライマーを用いてKunkel法に基づく部位特異的変異導入を行なうことができる。あるいは、PCRを用いた方法によって部位特異的変異導入を行なってもよい。

【 0 0 1 8 】

目的とする遺伝子は、既知のアミノ酸配列情報、またはそのタンパク質についての部分アミノ酸配列情報に基づき、適切なプローブを設計してハイブリダイゼーション技法、または、PCRによって取得することができる。変異導入のための鋳型を予めung⁻の宿主で調製しておくことによって、目的の変異の生じたDNAを効率よく複製させることができる。また、変異導入のためのプライマーは制限酵素部位が生じるように設計しておく、変異の確認のために便利である。

このような、宿主への遺伝子導入、遺伝子のクローニング、部位特異的変異導入等の分子生物学的手法は、ung⁻の宿主を含めて当業者に良く知られたものであり、例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, F.M. Ausubel et al. (eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)等を参照することができる。更に、それらの分子生物学的手法を行なうためのキット等も商業的に入手可能である。そのようにして導入した変異は塩基配列を決定することによって確認することができるが、変異導入用のプライマーに制限酵素部位を導入してある場合は、より簡便に、対応する制限酵素によって消化されることを指標に変異の導入を確認することができる。

【 0 0 1 9 】

このようにして得られた改変遺伝子は、適切な宿主-ベクター系を用いて発現させることができる。利用できる宿主には真核細胞、原核細胞のいずれも含まれるが、一般的には大腸菌のような微生物が好ましい。選択した宿主に応じて、前述の改変遺伝子を発現させるために必要な制御配列を有した発現ベクターにその改変遺伝子を組み込んだ組換えDNA分子を作製することができる。そのような発現ベクターは当業者によく知られており、多くの宿主-ベクター系が商業的に入

手可能である。そのようなベクターのうち、一般には高発現を目的とした宿主-ベクター系が好ましく、誘導が可能な宿主-ベクター系が特に好ましい。しかしながら、タンパク質の性質によっては高発現させると宿主に有害であることもある等、宿主-ベクター系の選択はタンパク質の性質にも依存するであろう。更に、必要ならば、選択した宿主に応じてコドン最適化してもよい。そのような組換えDNA分子を組み込んだ宿主は、当業者によく知られた方法によって培養され、産生されたタンパク質が回収される。

【 0 0 2 0 】

宿主細胞あるいは培地からのタンパク質の回収は宿主および産生されるタンパク質の性質に応じて一般的な方法によって行なえばよい。例えば、菌体から回収する場合は、超音波処理等によって細胞を破碎し、遠心分離によって残渣を除去し、更に硫酸沈殿、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等を組み合わせて目的のタンパク質を得ることができる。タンパク質が封入体として存在する場合は、6M グアニジン塩酸塩等によって可溶化した上で再構成させることができる。培地から回収する場合には、遠心分離によって菌体を除去した後、同様な方法で目的タンパク質を回収することができる。また、目的とするタンパク質が細胞膜に結合する性質を有する場合は、適切な界面活性剤を利用して可溶化してもよい。そのような可溶化法はいずれも当業者によく知られた方法であり、タンパク質の性質に応じて選択することができる。

【 0 0 2 1 】

得られたタンパク質の純度はSDS-ポリアクリルアミド電気泳動等によって確認することができる。得られたタンパク質の濃度は、当業者によく知られた方法によって、例えば、本明細書の実施例において記載したように、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質としてPIERCE社のBCA Protein Assay Kitを使用して測定することができる。

改変されたタンパク質の耐熱性は、そのタンパク質を熱処理した後に活性を測定することによって決定することができる。例えば、IPMDHの場合は以下のようにして測定することができる。アッセイバッファー (50mM CHES/KOH、pH9.5、200mM KCl、1mM NAD、0.4mM IPM、5mM MgCl₂) をセルに入れ、高温、例えば、50℃

～99℃で5分間プレインキュベーションする。次に所定の濃度に調製した酵素溶液を適量加えて軽く攪拌する。その後、所定の温度例えば50℃～75℃に維持し、NADHの増加を340nmにおける紫外光の吸光度によって測定する。また、IPMDHの比活性は、75℃において、1分間に1マイクロモルのNADHを生成する活性を1U（ユニット）とし、比活性はタンパク質1mgあたりのユニット(U)数として表すことができる。

【 0 0 2 2 】

ICDHについては、例えば、アッセイバッファー（10mM $MgCl_2$ 、0.4mM D.L-イソクエン酸、0.8mM NADP、100mM PIPES pH7.0）をセルに入れ、高温、例えば50℃～99℃において5分間インキュベーションした。次に所定の濃度に調製した酵素溶液を適量加え軽く攪拌する。その後、所定の温度、例えば、50℃～75℃に維持し、NADPHの増加量を340nmの吸収から求めることで酵素活性を測定することができる。1unitは70℃における1 μ moleのNADPが1分間に減少する量とすることができる。

このように、場合により、得られた一群の祖先型改変タンパク質について、各酵素に依存して選択される活性測定法によりその耐熱性を試験し、より耐熱性の優れたタンパク質を選抜してもよい。

【 0 0 2 3 】

【実施例】

以下に示す菌株および培地を使用した。

（1）大腸菌株

CJ236：ウラシル一本鎖DNA(UssDNA)調製用に使用した。ウラシル-グリコラーゼとdUTPaseを欠損している。

MC1061、JM109：遺伝子操作の宿主として用いた。

MA153：IPMDH大量発現のための宿主として用いた。leuB欠損株である。

（2）培地

LB寒天培地：1.0%バクトトリプトン、0.5%バクトイーストエキストラクト、1%NaCl、1.5%寒天。必要に応じてアンピシリンを100 μ g/ml添加した。

M9寒天培地：1 x M9塩、1mM $MgSO_4$ 、0.1mM $CaCl_2$ 、0.001%チアミン、0.2%

グルコース、1.5%寒天。大腸菌JM109のコンピテントセル作製の際に使用した。

2 x Y T 培地：1.6%バクトトリプトン、1.0%バクトイーストエキストラクト、0.5%NaCl。大腸菌の液体培養に使用した。必要に応じてアンピシリンを100 μ g/ml添加した。

(3) IPMDH活性測定

490 μ lのアッセイバッファー (50mM CHES/KOH、pH9.5、200mM KCl、1mM NAD、0.4mM IPM、5mM $MgCl_2$) をセルに入れ、50℃～75℃で5分間プレインキュベーションした。次に所定の濃度に調製した酵素溶液を10 μ l加え軽く攪拌した。その後プレインキュベーション温度と同じ温度に維持し、NADHの増加を340nmにおける紫外光の吸光度によって測定した。

(4) ICDH活性測定

490 μ lのアッセイバッファー (10mM $MgCl_2$ 、0.4mM D,L-イソクエン酸、0.8mM NADP、100mM PIPES pH7.0) をセルに入れ、50℃～75℃において5分間プレインキュベーションした。酵素溶液を10 μ l加え軽く攪拌した。その後、プレインキュベーション温度と同じ温度に維持し、NADPHの増加量を340nmの吸収から求めることで測定した。

【 0 0 2 4 】

実施例 1. スルフォロブス sp. 7 株からの祖先型 IPMDH の構築

(1) ウラシル1本鎖DNA (UssDNA) の調製

大腸菌CJ236のコンピテントセルにleuB発現プラスミドpE7-SB21 (図5) を導入した。得られた形質転換CJ236を2xYT培地で培養し、30mlの培養液を得た。培養液中のCJ236にヘルパーファージM13K07を感染させ、37℃にて2xYT培地で5時間振盪培養した。得られた培養液を4℃にて5000rpmで10分間遠心し、その上清を更に4℃にて6000rpmで10分間遠心して上清を得た。上清10mlからPEG/NaClを用いてファージを沈殿させた。得られたファージから常法に従って、UssDNAを10.9 μ gを得た。濃度は363 μ g/mlであった。

【 0 0 2 5 】

(2) 祖先型 IPMDH のアミノ酸配列の推定

現在までにクローニングされアミノ酸配列が明らかに成っているIPMDHおよびI

CDHのアミノ酸配列をマルチプルアラインメントした。その結果を表1に示す。次に、表1に示した各領域（a、b 或いはb' およびb''、c、d領域）について祖先型アミノ酸配列を推定した。この推定は、前述したような手順に従って、例えば152番残基については以下の様に行なった。

まず、これらの生物種を含む系統樹を近隣接合法で作成した（図3）。次にこの系統樹中で*Saccharomyces cerevisiae*と*Nuerospora crassa*のb領域を比較した。この二つの生物種における、スルフォロブスsp.7株152番残基に対応するアミノ酸残基はいずれもRであった。従って、この2種の祖先生物種の対応する位置のアミノ酸残基はRであると推定した。次に、*Escherichia coli*と*Agrobacterium tumefaciens*を比較すると、スルフォロブスsp.7株152番残基に対応するアミノ酸残基はそれぞれRとSであった。従って、この2種の祖先生物種の対応する位置のアミノ酸残基はこれだけでは推定することができないが、系統樹中（図3）で更に左側の枝における接合点では、もう一方の枝、即ち、*Saccharomyces cerevisiae*と*Nuerospora crassa*へ分岐している枝では前述したようにRであることが推定されているため、*Saccharomyces cerevisiae*と*Nuerospora crassa*、および*Escherichia coli*と*Agrobacterium tumefaciens*を加えた4種の共通の祖先生物種におけるこの位置のアミノ酸残基はRであると推定した。さらに、*Bacillus subtilis*のスルフォロブスsp.7株152番残基に対応するアミノ酸残基はRであることから、前述の4種に*Bacillus subtilis*を加えた5種の生物の祖先生物種において、この位置に対応するアミノ酸残基はRであると推定した。このようにして、図5で示された系統樹を左へ遡って、祖先型生物のIPMDHにおけるスルホフォブスsp.7株の152番位置に対応するアミノ酸残基はRであると推定した。

【0026】

このような手順を繰り返し、最終的に表1に記載された領域のアミノ酸配列についてその祖先型アミノ酸配列を決定した。次に、そのようにして決定した祖先型アミノ酸配列とスルフォロブスsp.7株のアミノ酸配列を比較し、祖先型配列と異なるフルフォロブスsp.7株のアミノ酸残基および位置を決定した。その結果、M91、I95、K152、G154、A259、F261、Y282の各アミノ酸残基および位置が祖先型と異なることが明らかになった。ここで、例えばM91は91番のM（メチオニン）

残基を表す。他の表記についても同様である。

これらを表 1 において下線で示した。また、前述の手順に従って決定した祖先型アミノ酸配列および、改変すべきアミノ酸残基の位置および種類も併せて表 1 に示した。なお、表 1 中で x と記載された残基は祖先型が 1 種類にされなかった位置である。

これら結果から、祖先型酵素の 91 番アミノ酸残基は L、95 番アミノ酸残基は L、152 番アミノ酸残基は R、154 番アミノ酸残基は A、259 番アミノ酸残基は S、261 番アミノ酸残基は P、282 番アミノ酸残基は L であると決定した。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

表 1. IPMDHおよびICDHのアミノ酸配列のマルチプルアラインメント

酵素および生物種	アミノ酸部分配列							
IPMDH	89	97	150	158	256	563	280	285
Sulfolobus sp. strain 7	YD <u>MY</u> AN <u>IR</u> P—	I <u>A</u> K <u>V</u> G—	LNFA—	VHGA <u>AF</u> DI—	MM <u>Y</u> ERM			
Thermus thermophilus	QDLFANLRP—	VARVA—	FEAA—	VHGSAPDI—	MMLEHA			
Bacillus subtilis	LDLFANLRP—	VIREG—	FKMA—	VHGSAPDI—	MLLRTS			
Escherichia coli	FKLFSNLRP—	IARIA—	FESA—	AGGSAPDI—	LLLRYs			
Agrobacterium tumefaciens	LELFANLRP—	IASVA—	FELA—	VHGSAPDI—	MCLRYs			
Saccharomyces cerevisiae	LQLYANLRP—	ITRMAAF—	MA—	CHGSAPDL—	MMLKLS			
Neurospora crassa	LGTYGNLRP—	IARLAGF—	LA—	IHGSAPDI—	MMLRYs			
ICDH	89	97	150	158	256	563	280	285
Saccharomyces cerevisiae	FGLFANVRP—	VIRYA—	FEYA—	VHGSAPDI—	MMLNHM			
Bos Taurus (3/4)	FDLYANVRP—	IAEFA—	FEYA—	VHGTAPDI—	MMLRHM			
Bacillus subtilis	LDLFDVCLRP—	LVRAA—	IDYA—	THGTAPKY—	LLLEHL			
Escherichia coli	LDLYICLRP—	LVRAA—	IEYA—	THGTAPKY—	MMLRHM			
祖先型生物種 (推定)	xDLxANLRP—	IARxAx	FExA—	VHGSAPDI—	MMLxxx			
改変位置およびアミノ酸								
	L	L	R R	S P	L			
	<a 領域>	<b 領域>		<c 領域>	<d 領域>			
	b' b''							

上記表中の部分アミノ酸配列は順に配列番号 1～48として配列表に記載した。

【 0 0 2 8 】

(3) 変異導入用プライマーの設計

祖先型IPMDHおよびICDHのアミノ酸配列が決定されたので、a、b、c、dの各領域、およびそれらの組み合わせの領域におけるアミノ酸残基の置換によっていくつかの祖先型変異体を作製した。それらの祖先型変異体におけるアミノ酸残基置換は以下のとおりである。すなわち、a領域祖先型変異 (M91LおよびI95L)、b'

領域祖先型変異 (K152R)、b'領域祖先型変異 (G154A)、b領域祖先型変異 (K152RおよびG154A)、c領域祖先型変異 (A259SおよびF261P)、d領域祖先型変異 (Y282L)、a、b、c、d祖先型変異 (M91L、I95L、K152R、G154A、A259S、F2651PおよびY282L) である。ここで、例えばM91Lなる表記は91番のM (メチオニン) 残基をL (ロイシン) 残基に置換することを表す。他の記号も同様である。

【 0 0 2 9 】

これらの祖先型変異体を部位特異的変異導入法によって作製するために以下のプライマーを設計した。各プライマーは、スルフォロブス sp. 7 株のIPMDHの塩基配列 (配列番号49) 及びアミノ酸配列 (配列番号50) を参考にして設計した (図6および図7)。

【 0 0 3 0 】

a領域祖先型変異導入用プライマー、P1

5'-TTTGCTGGTCTTAAGTTGGCATAAAGATCATAAATTTGTC-3' (配列番号51)

下線部は制限酵素AflIIIの認識部位である。

b'領域祖先型変異導入用プライマー、P2

5'-AGTTTAGCCCTACGCTCGCGATTCTCTCAGAAGC-3' (配列番号52)

下線部は制限酵素NruIの認識部位である。

b''領域祖先型変異導入用プライマー、P3

5'-AATGCAAAGTTTAGCGCTACTTTTGCTATTC-3' (配列番号53)

下線部はEco47 IIIの認識部位である。

b領域祖先型二重変異導入用プライマー、P4

5'-TGCAAAGTTTAGCGCTACTCTTGCTATTCTCTC-3' (配列番号54)

下線部はEco47 IIIの認識部位である。

c領域祖先型変異導入用プライマー、P5

5'-TCCAGCAATGTCCGGAGCACTACCGTGTACTG-3' (配列番号55)

下線部はMroIの認識部位である。

d領域祖先型変異導入用プライマー、P6

5'-TCATACATTCTCTCGAGCATCATACTTAC-3'

(配列番号56)

下線部はXhoIの認識部位である。

a bcd祖先型変異は、上記のプライマーの組み合わせによって導入される変異を全て含むものであるため、別途プライマーを調製しなかった。

<配列表フリーテキスト>

配列番号47～52：部位特異的変異導入のためのプライマー

【0031】

(4) Kunkel法による変異導入

常法に従って、配列番号3～8に記載のプライマーをそれぞれTE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) に溶解して10pmol/ μ lの溶液を作製した。このプライマー溶液1 μ lを総量10 μ lとして常法に従って、ポリヌクレオチドキナーゼによってリン酸化した。反応後は70℃にて10分間処理をして酵素失活させた。この反応液各3 μ lずつとり、(1)で得られたUssDNA1.5 μ lと混合し、アニーリングさせた。従って、この混合液中には、リン酸化した配列番号3～8の全てのプライマーが含まれていた。アニーリングは、10xアニーリングバッファー (200mM Tris-HCl, 20mM MgCl₂, 100mM DTT, pH8.0) 中、総量20 μ lにて行なった。混合液を70℃に加温し、続いて約30℃まで室温に放置して冷却した。

【0032】

アニーリング後の溶液に10x合成バッファー (50mM Tris-HCl, 20mM MgCl₂, 5mM dNTPs, 10mM ATP, 20mM DTT, pH7.9) を2 μ l、T4 DNAリガーゼを1 μ l、T4 DNAポリメラーゼを1 μ l加えて氷中に5分間、続いて室温に5分間置き、さらに37℃にて90分間インキュベーションした。反応液を4 μ lとり、大腸菌MC1061コンピテントセル100 μ lと混合し、0℃にて20分間、42℃にて1分間、0℃にて2分間静置し、2xYT培地を450 μ l加えて37℃にて1時間放置した。この培養液138.5 μ lを100 μ g/mlのアンピシリンを含む2xYT液体培地5mlに分注し、一晚培養後に

菌体からアルカリ-SDS法によってプラスミドDNAを回収した。

【0033】

得られたDNAを用いて大腸菌MC1061を再度形質転換し、100 μ g/mlのアンプシリンを含むLB寒天培地上で形質転換コロニーを選抜した。これらのコロニーを培養し、そこからプラスミドDNAを回収して制限酵素部位の有無を確認した。変異が導入されたならば、変異部位に対応するプライマーに存在する制限酵素でDNAが切断されるはずである。

【0034】

その結果、上記a～dの領域、またはこれらの組み合わせに祖先型変異が導入されたプラスミドがいくつか得られた。

このようにして得られた変異体のうち、(M91LおよびI95L)祖先型変異体、K152R祖先型変異体、(G154A)祖先型変異体、(K152RおよびG154A)祖先型変異体、(A259SおよびF261P)祖先型変異体、(Y282L)祖先型変異体、を各々、a変異体、b'変異体、b''変異体、b変異体、c変異体、d変異体と命名し、対応する発現プラスミドをそれぞれ、pE7-SB21a、pE7-SB21b'、pE7-SB21b''、pE7-SB21b、pE7-SB21c、pE7-SB21dと命名した。

しかしながら、abcd領域祖先型変異体は得られなかったもので、以下のようにしてa領域変異体とbcd領域祖先型変異体を用いてabcd領域祖先型変異体を構築した。

上述のようにして得られたbcd領域祖先型変異体プラスミドpE7-SB21bcd DNAをSmaIで切断した。一方、a変異体プラスミドpE7-SB21a DNAをXbaIとEcoRIで切断し、目的とする酵素がコードされたDNA断片をpUC118のXbaI-EcoRIマルチクロニング部位にサブクロニングして、プラスミドpUC118-SB21aを得た。pUC118-SB21aをSmaIで切断し、上記のSmaI切断bcd領域祖先型変異体プラスミドDNAとライゲーションしてpUC118-SB21abcdを得た。次にpUC118-SB21abcdおよびpE7-SB21をXbaIとEcoRIで消化し、両者を混合してabcd領域祖先型変異体のための発現プラスミドpE7-SB21abcdを得た。

pE7-SB21a、pE7-SB21b'、pE7-SB21b''、pE7-SB21b、pE7-SB21c、pE7-SB21dおよびpE7-SB21abcdが目的とする祖先型変異体を有することは、それぞれに対応する

制限酵素切断部位の有無を調べ、および、塩基配列を決定して確認した。

これらのプラスミドの構築の概略を図 8 に記載した。

【 0 0 3 5 】

実施例 2. スルフォロブス sp. IPMDH および祖先型 IPMDH の精製

天然型、祖先型変異体のそれぞれのプラスミドを有する大腸菌 MA153 のコロニーをアンピシリン $100 \mu\text{g/ml}$ を含む 2xYT 培地 100ml に摂取し、一晚培養した後、それぞれアンピシリン $100 \mu\text{g/ml}$ を含む 10L の 2 x YT 培地に摂取した。37℃ にて OD600=0.6 まで振盪培養し、IPTG を最終濃度 0.4mM になるように添加した。更に振盪培養を 2 時間行なった後菌体を 4℃ にて 7000rpm x 10 分間の遠心によって回収した。得られた菌体をバッファー I (20mM KHPO_4 、0.5mM EDTA、pH7.0) に懸濁し、4℃ にて 7000rpm x 20 分間の遠心によって洗浄した。直ちに次のステップに入らない場合は、-80℃ で菌体を保存した。得られた菌体は 19.6g であった。

【 0 0 3 6 】

菌体に 1mM DTT を含む 2 倍量のバッファー I を加えて懸濁した。懸濁細胞を超音波破碎し、4℃ にて、30,000rpm x 20 分間の遠心によって沈殿を除去した。上清を 75℃ にて 20 分間熱処理し、4℃ にて 30,000rpm x 20 分間遠心して沈殿した変性タンパク質を除去した。

上清をバッファー I で平衡化した陰イオン交換カラム DE-52 につけ、素通り画分を回収した。得られた画分に最終濃度 1M となるように 3M 硫酸アンモニウム (AS) 溶液を加え 4℃ にて約 1 時間放置後、4℃、30,000rpm x 20 分間の遠心によって沈殿を除去した。上清を 1M の AS を含むバッファー I で平衡化した疎水性カラムブチル-Toyoperl 650s カラムに通し、AS 濃度 1M → 0 M の直線勾配によってタンパク質を溶出させた。得られた各画分について活性測定を行ない、活性のあった画分をまとめ、バッファー II (20mM CHES/KOH 、0.5mM EDTA、pH9.3) に対して透析した。

【 0 0 3 7 】

透析後のタンパク質溶液を、バッファー II で平衡化した陰イオン交換カラム Resource Q カラムにつけ、KCl 濃度 0M → 0.1M の直線勾配でタンパク質を溶出した。得られた各画分を各々バッファー I に対して透析し SDS-PAGE によって純度を確認した。SDS-PAGE によって単一バンドが確認された画分を集めて Cetnriprep30

を用いて1mg/mlにまで濃縮した。タンパク質濃度は、BSAを標準として、PIERCE社のBCA Protein Assay Reagent Kitを用いて測定した。精製結果を表2に示す。

【表 2】

菌体 19.67g	総活性(U)	収率 (%)	タンパク質 (mg)	比活性 (U/mg)	純度 (倍数)
粗抽出物	—	—	2278.3	—	—
加熱後	34.74	100.0	230.5	0.15	1.00
DE-52	33.93	97.7	80.67	0.42	2.80
ブチル - Toyopearl	33.72	97.1	7.12	5.02	33.47
ResourceQ	15.05	43.3	1.60	11.00	73.33

【 0 0 3 8 】

実施例 3. スルフォロブス sp. の IPMDH および 祖先型 IPMDH の 耐熱性 測定

スルフォロブス sp. IPMDH の耐熱性は pH7.0 では非常に高いので、99℃ での耐熱性を測定した。すなわち、99℃ において活性の半減する時間（半減期 $T_{1/2}$ ）を求めて耐熱性の指標とした。

天然および変異（祖先型）酵素の 99℃ における半減期を以下のように測定した。リン酸カリウムバッファー（20mM KHP04、0.5mM EDTA、1mM DTT、pH7.0）を用いて、b'、b''、b、c、d 変異体についてはタンパク質濃度 0.25mg/ml、abcd 変異体についてはタンパク質濃度 1.0mg/ml として酵素溶液を調製した。天然型 IPMDH についてもタンパク質濃度 0.25mg/ml または 1.0mg/ml となるように酵素溶液を調製した。これらの酵素溶液を 99℃ において、10 分間、20 分間、30 分間、60 分間、120 分間熱処理をした。処理後、氷中に 5 分間静置し、12,000rpm、4℃ にて 20 分間遠心して上清を回収した。各上清 10μl を用いて 75℃ において活性測定をした。各サンプルについて 3 回の測定を行ない、その平均値を残存活性の測定値とした。横軸に時間を取り、縦軸に時間 0 を 100 とした相対活性を取り、各測定値をプロットして、相対活性 50% となる時間を半減期 $T_{1/2}$ とした。同時に比活性の測

定も行なった。それらの結果を表3および表4に示す。

【0039】

【表3】

表3. 天然型IPMDHおよびb'、b''、b、c、d変異体の半減期と比活性

型	T _{1/2} (分)	比活性(u/mg)
スフォロプス sp.天然型 IPMDH	10.1	11.0
b'変異体	15.8	11.0
b''変異体	13.1	10.9
b変異体	12.8	14.7
c変異体	16.4	17.5
d変異体	16.7	11.6

【0040】

【表4】

表4. 天然型IPMDHおよびabcd変異体の半減期と比活性

型	T _{1/2} (分)	比活性(u/mg)
スフォロプス sp.天然型 IPMDH	15.3	11.0
abcd 変異体	23.7	11.0

【0041】

これらの結果から、b'、b''、b、c、dおよびabcd変異体のいずれも天然型に比較して耐熱性が向上していることが明らかになった。また、b'、b''、d変異体については比活性も同時に増大した。

【0042】

実施例4. *Thermus thermophilus*からの祖先型IPMDHの構築

(1) 祖先型IPMDHのアミノ酸配列の推定

現在クローニングされている代表的な生物のIPMDH及びICDHのアミノ酸配列をアライメントした(図9: 図中の各アミノ酸配列は、左上から順に配列番号57~89として配列表に記載した)。その中で生物種間で保存性が高く、かつサーマ

ス・サーモフィルス (*Thermus thermophilus*) で異なるアミノ酸部位いくつかを
探し出した。更に IPMDH と ICDH の複合系統樹 (図 3) と合わせて *Thermus* の手前で分
岐したアミノ酸残基と分岐前のアミノ酸残基がはっきりと予測できる部位を推定
した。図 10 に *Thermus* の 53 番目にあたる各生物でのアミノ酸残基を示した。こ
れをみると明らかに *Thermus* は Leu から Phe に分岐したことが推測される。このよ
うにして明確に推定できた祖先型変異は、F53L、V181T、P324T の 3 つとなった。F
53L、V181T、P324T 等の記号の意味は実施例 1 で使用したものと同様である。

【 0 0 4 3 】

(2) 変異導入

Veronique Picard らの方法 (Picard, VC. et. al., Nucleic Acid Research,
22, 2587-2591 (1994)) に従って、PCR を利用して部位特異的に変異を導入した。
すなわち、プラスミド pET21c に *Thermus thermophilus* IPMDH (NCBI アクセシ
ョン番号 AAA16706) がクローニングされたプラスミド (図 11) を鋳型として、
まず 5' プライマーから変異プライマーまでを増幅し、次に 3' プライマーを加え
て全長を増幅した。さらに 5' プライマーを加えて全長をさらに増幅した。しか
し P324T は変異部位が IPMDH の 3' 末端側にあったため、この手順による変異導入
が出来なかった。このため 5P324T3 という逆オリゴを作製し 3' 末端から増幅を
行い変異を導入した。変異導入に使用したプライマーは以下の通りである。

5' プライマー-T7T : 5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3' (配列番号 90)

5' プライマー-T7P : 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (配列番号 91)

F53L 変異導入用 : 5'-GGGCTCGGGCAAGGGCTCGC-3' (配列番号 92)

V181T 変異導入用 : 5'-AGGTCCGGGGTCGGGGTCTCC-3' (配列番号 93)、

P324T 変異導入用 : 5'-CTTGTCCACGCTCGTCACGTGCTTCCTG3' (配列番号 94)

【 0 0 4 4 】

< 配列表フリーテキスト >

配列番号 90~94 : 部位特異的変異導入用オリゴヌクレオチド

【 0 0 4 5 】

実施例 5. *Thermus thermophilus* の野生型 IPMDH および祖先型 IPMDH の比較

(1) IPMDH および祖先型 IPMDH の精製

実施例 2 と同様な方法で *Thermus thermophilus* の野生型 IPMDH および祖先型 IPMDH を精製した。但し、*Thermus thermophilus* の IPMDH 遺伝子は G+C 含量が高く、そのままではタンパク質発現量が低いため、遺伝子の最初の幾つかのコドン 3 文字目を A または T に変えた遺伝子を用いることによりタンパク質を多く発現させた。1L の培養液から得られた最終収量は、野生型 184mg/L、F53L 変異祖先型は 11.3mg/L、V181T 変異祖先型は 8.4mg/L、P324T 変異祖先型は 11.1mg/L であった。

(2) 祖先型 IPMDH の耐熱性測定

野生型 IPMDH および祖先型 IPMDH を熱処理し、その残存活性を測定した。いずれの実験も 1 つのサンプルに対し 3 回測定を行い、その平均を測定値として残存活性を求めた。

野生型及び祖先型 IPMDH をタンパク溶液 (20mM KHPO_4 pH7.6・0.5mM EDTA) を 0.4 mg/ml に調製し、各サンプル 50 μ l を 0.5ml のマイクロチューブに入れ 80、82、84、86、88、90℃ で 10 分間熱処理後の 50℃ における活性を測定し、活性が 50% になるときの温度に対する残存活性を求めた。その結果を図 12 に示した。その結果、活性が 50% になるときの温度は野生型では 85.5℃、F53L 変異型では 83.5℃、V181T 変異型では 86.8℃、P324T 変異型では 86.5℃ であった。また野生型と比べると、F53L 変異型は 2℃ ほど下がってしまったが、V181T 変異型は 1.3℃、P324T 変異型は 1.0℃ 上昇した。

【 0 0 4 6 】

更に、86℃ において 0、5、10、15、20 分間熱処理後の活性を 50℃ において測定し活性が 50% になるまでの時間を測定した。その結果を表 5 に示した。

【表 5】

表 5. 残存活性が50%に低下するまでの時間 ($T_{1/2}$)

	$T_{1/2}$ (分)	$\Delta T_{1/2}$ (分)
野生型	9. 4	
F53L 変異型	3. 5	- 5. 9
V181T 変異型	22. 1	+ 12. 7
P324T 変異型	12. 5	+ 3. 1

【0047】

表 5 に示されたように、野生型と比べると F53L は 5.9 分下がってしまったが、V181T は 12.7 分、P324T は 3.1 分耐熱化した。

ここで、F53L 変異型は耐熱性が野生型よりも低下したが、これは以下の要因によると考えられる：53 番アミノ酸残基の周りのアミノ酸配列を他の生物間で比較してみると *Thermus thermophilus* では 58 番目が Arg だが、他の生物間では Leu や Val であった。このことより 53 番目を Leu にしたことで 58 番目の Arg との間の空間を Phe のように埋めることができず、その結果構造が不安定化し耐熱性が下がったと考えられる。

【0048】

(3) CD スペクトル

野生型及び F53L、V181T、P324T の各変異型 IPMDH を 20mM KHPO_4 (pH7.6) 溶液で 0.1mg/ml に調製して CD スペクトル (円二色性スペクトル) を用いて 210nm-250nm のタンパク質の 2 次構造を調べた。その結果各変異型は野生型と比較して変化はなかった。従って、これらの変異はタンパクの 2 次構造にあまり変化を与えないことが示された。

【0049】

実施例 6. *Caldococcus noboribetetus* の ICDH および祖先型 ICDH の構築

(1) 祖先型 ICDH のアミノ酸配列の推定

NCBI のデータベースから代表的な生物の IPMDH と様々生物の ICDH の配列を入手し、配列アライメントソフトの Clustal X を用いてアライメントを行った (図

13)。またこれらの配列をもとに、系統樹作成ソフトのPuzzleを用いて IPMDH と ICDHの混合系統樹を作成した。

アライメント結果と混合系統樹の常法に基づき、実施例1および4と同様にA336F、Y309I、I310L、I321L、A325P、G326Sの6つ祖先型変異が推定された。A336F等の記号の意味は、実施例1および4と同じである。このうちY309IとI310L、A325PとG326Sは隣り合っており同じ二次構造上にあるので二重変異として考え、Y309I/I310LをN1変異、I321LをN2変異、A325P/G326SをN3変異、A336FをN4変異とした。

(2) 変異導入

実施例1および4と同様な方法で、プラスミドpET21cに*Caldococcus noboribetetus*のICDH(NCBIアクセッション番号BAA13177) がクローニングされたプラスミドを鋳型としてPCRによりN1変異、N2変異、N3変異、N4変異を導入した。

【0050】

実施例7. *Caldococcus noboribetetus*のICDHおよび祖先型ICDHの性質の比較

(1) *Caldococcus noboribetetus*野生型ICDHおよび祖先型ICDHの精製

実施例2と同様にして、pET21cおよびN1-N4の各変異を導入した変異pET21cと大腸菌を用いて*Caldococcus noboribetetus*野生型ICDHおよび祖先型ICDHを大量発現させ、常法に従って、野生型ICDHおよび祖先型ICDHを精製した。1Lの培養液から、野生型ICDH 10mg、N1変異型ICDH 15.4mg、N2変異型 10.9mg、N3変異型14.2mg、N3変異型14.2mg、N4変異型4.39mgのICDHが得られた。

(2) 祖先型ICDHの耐熱性測定

耐熱性を評価するため、精製した*Caldococcus noboribetetus* ICDHの野生型と各変異体を様々な温度(80、82、84、86、88、90、92、94℃)で10分間熱処理し、そのあとの残存活性を70℃において測定した。残存活性と温度との関係は実施例5と同様(図12を参照せよ)であり、活性が50%になる温度($T_{1/2}$)は野生型およびN1-N4変異型ICDHについてこの順に、87.5、88.8、88.8、91.3、74.0℃であった。野生型ICDHに比べてN1、N2変異型ICDHは約1℃、N3変異型ICDHは約4℃耐熱性が上昇した。しかしN4変異型ICDHは約13℃下がった。

また80℃における各変異体の比活性を測定した。変異型ICDHの相対比活性はN1

からN4の順にそれぞれ約72、62、127、21%（野生型を100%とする）であった。N1、N2およびN3変異型ICDHの比活性にはそれほど激しい差は見られなかったが、耐熱性が大幅に下がったN4変異型ICDHについては比活性もまた大きく下がった。

【 0 0 5 1 】

次に、N4変異型ICDHの耐熱性が著しく低下したので、補助的に立体構造を解析した。その結果、Ala336の周辺にはLeu327、Tyr363、Leu364があり、疎水コアが形成されていると推定された。Ala336、Leu327に相当する部分は他の生物においては、Phe-Ala、Phe-Gly、Tyr-Ala、Ala-Metというように片方が大きい残基の場合、もう片方は小さい残基というペアで残基が変化していた。これらの事実を考え合わせると、N4変異型ICDHの耐熱性が下がったのは、Ala336をPheに置換したことによりこの領域がかなり密な状態になり、立体障害をおこした為であると考えられる。

【 0 0 5 2 】

【発明の効果】

本発明により、タンパク質の2次構造および3次構造の情報を使用せずに、1次構造の情報のみからタンパク質の耐熱性を向上させることができる。特に、好熱菌の産生する耐熱性タンパク質、特に耐熱性の酵素の耐熱性を更に向上させることができる。そのような耐熱性の酵素を使用すれば、反応の際に温度制御を行なう必要がなく、高温で反応させることができるため反応速度が速く、また高温で反応させることができるため不要な微生物のコンタミネーションも最小に抑えることができる。

【 0 0 5 3 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> A method for improving the thermostability of a
protein, a protein having improved thermostability and

a nucleic acid sequence encoding the protein

<130> Y1I0476

<140>

<141>

<150> JP 2000-201920

<151> 2000-07-04

<160> 104

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Sulfolobus sp.

<400> 1

Tyr Asp Met Tyr Ala Asn Ile Arg Pro

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Sulfolobus sp.

<400> 2

Ile Ala Lys Val Gly Leu Asn Phe Ala

1

5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Sulfolobus sp.

<400> 3

Val His Gly Ala Ala Phe Asp Ile

1

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Sulfolobus sp.

<400> 4

Met Met Tyr Glu Arg Met

1

5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Thermus thermophilus

<400> 5

Gln Asp Leu Phe Ala Asn Leu Arg Pro

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 6

Val Ala Arg Val Ala Phe Glu Ala Ala

1

5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 7

Val His Gly Ser Ala Pro Asp Ile

1

5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 8

Met Met Leu Glu His Ala

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 9

Leu Asp Leu Phe Ala Asn Leu Arg Pro

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 10

Val Ile Arg Glu Gly Phe Lys Met Ala

1

5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 11

Val His Gly Ser Ala Pro Asp Ile

1

5

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 12

Met Leu Leu Arg Thr Ser

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 13

Phe Lys Leu Phe Ser Asn Leu Arg Pro

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 14

Ile Ala Arg Ile Ala Phe Glu Ser Ala

1

5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 15

Ala Gly Gly Ser Ala Pro Asp Ile

1

5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 16

Leu Leu Leu Arg Tyr Ser

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 17

Leu Glu Leu Phe Ala Asn Leu Arg Pro

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 18

Ile Ala Ser Val Ala Phe Glu Leu Ala

1

5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 19

Val His Gly Ser Ala Pro Asp Ile

1

5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 20

Met Cys Leu Arg Tyr Ser

1

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 21

Leu Gln Leu Tyr Ala Asn Leu Arg Pro

1

5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 22

Ile Thr Arg Met Ala Ala Phe Met Ala

1

5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 23

Cys His Gly Ser Ala Pro Asp Leu

1

5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 24

Met Met Leu Lys Leu Ser

1

5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 25

Leu Gly Thr Tyr Gly Asn Leu Arg Pro

1

5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 26

Ile Ala Arg Leu Ala Gly Phe Leu Ala

1

5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 27

Ile His Gly Ser Ala Pro Asp Ile

1

5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 28

Met Met Leu Arg Tyr Ser

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 29

Phe Gly Leu Phe Ala Asn Val Arg Pro

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 30

Val Ile Arg Tyr Ala Phe Glu Tyr Ala

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 31

Val His Gly Ser Ala Pro Asp Ile

1

5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 32

Met Met Leu Asn His Met

1

5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 33

Phe Asp Leu Tyr Ala Asn Val Arg Pro

1

5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 34

Ile Ala Glu Phe Ala Phe Glu Tyr Ala

1

5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 35

Val His Gly Ser Ala Pro Asp Ile

1

5

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 36

Met Met Leu Arg His Met

1

5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 37

Leu Asp Leu Phe Val Cys Leu Arg Pro

1

5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 38

Leu Val Arg Ala Ala Ile Asp Tyr Ala

1

5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 39

Thr His Gly Thr Ala Pro Lys Tyr

1

5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 40

Leu Leu Leu Glu His Leu

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 41

Leu Asp Leu Tyr Ile Cys Leu Arg Pro

1 5

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 42

Leu Val Arg Ala Ala Ile Glu Tyr Ala

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 43

Thr His Gly Thr Ala Pro Lys Tyr

1

5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 44

Met Met Leu Arg His Met

1

5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:predicted
ancestor sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> (1)

<220>

<221> UNSURE

<222> (4)

<400> 45

Xaa Asp Leu Xaa Ala Asn Leu Arg Pro

1

5

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:predicted
ancestor sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> (4)

<220>

<221> UNSURE

<222> (6)

<220>

<221> UNSURE

<222> (9)

<400> 46

Ile Ala Arg Xaa Ala Xaa Phe Glu Xaa Ala

1

5

10

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:predicted
ancestor sequence

<400> 47

Val His Gly Ser Ala Pro Asp Ile

1

5

<210> 48

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:predicted
 ancestor sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> (4)..(6)

<400> 48

Met Met Leu Xaa Xaa Xaa

1

5

<210> 49

<211> 1014

<212> DNA

<213> Sulfolobus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1011)

<400> 49

atg ggc ttt act gtt gct tta ata caa gga gat gga att gga cca gaa 48

Met Gly Phe Thr Val Ala Leu Ile Gln Gly Asp Gly Ile Gly Pro Glu

1

5

10

15

ata gta tct aaa tct aag aga ata tta gcc aaa ata aat gag ctt tat 96

Ile Val Ser Lys Ser Lys Arg Ile Leu Ala Lys Ile Asn Glu Leu Tyr

20

25

30

tct ttg cct atc gaa tat att gaa gta gaa gct ggt gat cgt gca ttg 144
Ser Leu Pro Ile Glu Tyr Ile Glu Val Glu Ala Gly Asp Arg Ala Leu

35

40

45

gca aga tat ggt gaa gca ttg cca aaa gat agc tta aaa atc att gat 192
Ala Arg Tyr Gly Glu Ala Leu Pro Lys Asp Ser Leu Lys Ile Ile Asp

50

55

60

aag gcc gat ata att ttg aaa ggt cca gta gga gaa tcc gct gca gac 240
Lys Ala Asp Ile Ile Leu Lys Gly Pro Val Gly Glu Ser Ala Ala Asp

65

70

75

80

gtt gtt gtc aag tta aga caa att tat gat atg tat gcc aat att aga 288
Val Val Val Lys Leu Arg Gln Ile Tyr Asp Met Tyr Ala Asn Ile Arg

85

90

95

cca gca aag tct atc ccg gga ata gat act aaa tat ggt aat gtt gat 336
Pro Ala Lys Ser Ile Pro Gly Ile Asp Thr Lys Tyr Gly Asn Val Asp

100

105

110

ata ctt ata gtg aga gaa aat act gag gat tta tac aaa ggt ttt gaa 384
Ile Leu Ile Val Arg Glu Asn Thr Glu Asp Leu Tyr Lys Gly Phe Glu

115

120

125

cat att gtt tct gat gga gta gcc gtt ggc atg aaa atc ata act aga 432
His Ile Val Ser Asp Gly Val Ala Val Gly Met Lys Ile Ile Thr Arg

130

135

140

ttt gct tct gag aga ata gca aaa gta ggg cta aac ttt gca tta aga 480
Phe Ala Ser Glu Arg Ile Ala Lys Val Gly Leu Asn Phe Ala Leu Arg
145 150 155 160

agg aga aag aaa gta act tgt gtt cat aag gct aac gta atg aga att 528
Arg Arg Lys Lys Val Thr Cys Val His Lys Ala Asn Val Met Arg Ile
165 170 175

act gat ggt tta ttc gct gaa gca tgc aga tct gta tta aaa gga aaa 576
Thr Asp Gly Leu Phe Ala Glu Ala Cys Arg Ser Val Leu Lys Gly Lys
180 185 190

gta gaa tat tca gaa atg tat gta gac gca gca gcg gct aat tta gta 624
Val Glu Tyr Ser Glu Met Tyr Val Asp Ala Ala Ala Ala Asn Leu Val
195 200 205

aga aat cct caa atg ttt gat gta att gta act gag aac gta tat gga 672
Arg Asn Pro Gln Met Phe Asp Val Ile Val Thr Glu Asn Val Tyr Gly
210 215 220

gac att tta agt gac gaa gct agt caa att gcg ggt agt tta ggt ata 720
Asp Ile Leu Ser Asp Glu Ala Ser Gln Ile Ala Gly Ser Leu Gly Ile
225 230 235 240

gca ccc tct gcg aat ata gga gat aaa aaa gct tta ttt gaa cca gta 768
Ala Pro Ser Ala Asn Ile Gly Asp Lys Lys Ala Leu Phe Glu Pro Val
245 250 255

cac ggt gca gcg ttt gac att gct gga aag aat ata ggt aat ccc act 816

His Gly Ala Ala Phe Asp Ile Ala Gly Lys Asn Ile Gly Asn Pro Thr

260

265

270

gca ttt tta ctt tct gta agt atg atg tat gaa aga atg tat gag cta 864

Ala Phe Leu Leu Ser Val Ser Met Met Tyr Glu Arg Met Tyr Glu Leu

275

280

285

tct aat gac gat aga tat ata aaa gct tca aga gct tta gaa aac gct 912

Ser Asn Asp Asp Arg Tyr Ile Lys Ala Ser Arg Ala Leu Glu Asn Ala

290

295

300

ata tac tta gtc tac aaa gag aga aaa gcg tta acc cca gat gta ggt 960

Ile Tyr Leu Val Tyr Lys Glu Arg Lys Ala Leu Thr Pro Asp Val Gly

305

310

315

320

ggt aat gcg aca act gat gac tta ata aat gaa att tat aat aag cta 1008

Gly Asn Ala Thr Thr Asp Asp Leu Ile Asn Glu Ile Tyr Asn Lys Leu

325

330

335

ggc taa

1014

Gly

<210> 50

<211> 337

<212> PRT

<213> Sulfolobus sp.

<400> 50

Met Gly Phe Thr Val Ala Leu Ile Gln Gly Asp Gly Ile Gly Pro Glu

1 5 10 15

Ile Val Ser Lys Ser Lys Arg Ile Leu Ala Lys Ile Asn Glu Leu Tyr

20 25 30

Ser Leu Pro Ile Glu Tyr Ile Glu Val Glu Ala Gly Asp Arg Ala Leu

35 40 45

Ala Arg Tyr Gly Glu Ala Leu Pro Lys Asp Ser Leu Lys Ile Ile Asp

50 55 60

Lys Ala Asp Ile Ile Leu Lys Gly Pro Val Gly Glu Ser Ala Ala Asp

65 70 75 80

Val Val Val Lys Leu Arg Gln Ile Tyr Asp Met Tyr Ala Asn Ile Arg

85 90 95

Pro Ala Lys Ser Ile Pro Gly Ile Asp Thr Lys Tyr Gly Asn Val Asp

100 105 110

Ile Leu Ile Val Arg Glu Asn Thr Glu Asp Leu Tyr Lys Gly Phe Glu

115 120 125

His Ile Val Ser Asp Gly Val Ala Val Gly Met Lys Ile Ile Thr Arg

130 135 140

Phe Ala Ser Glu Arg Ile Ala Lys Val Gly Leu Asn Phe Ala Leu Arg

145 150 155 160

Arg Arg Lys Lys Val Thr Cys Val His Lys Ala Asn Val Met Arg Ile

165

170

175

Thr Asp Gly Leu Phe Ala Glu Ala Cys Arg Ser Val Leu Lys Gly Lys

180

185

190

Val Glu Tyr Ser Glu Met Tyr Val Asp Ala Ala Ala Asn Leu Val

195

200

205

Arg Asn Pro Gln Met Phe Asp Val Ile Val Thr Glu Asn Val Tyr Gly

210

215

220

Asp Ile Leu Ser Asp Glu Ala Ser Gln Ile Ala Gly Ser Leu Gly Ile

225

230

235

240

Ala Pro Ser Ala Asn Ile Gly Asp Lys Lys Ala Leu Phe Glu Pro Val

245

250

255

His Gly Ala Ala Phe Asp Ile Ala Gly Lys Asn Ile Gly Asn Pro Thr

260

265

270

Ala Phe Leu Leu Ser Val Ser Met Met Tyr Glu Arg Met Tyr Glu Leu

275

280

285

Ser Asn Asp Asp Arg Tyr Ile Lys Ala Ser Arg Ala Leu Glu Asn Ala

290

295

300

Ile Tyr Leu Val Tyr Lys Glu Arg Lys Ala Leu Thr Pro Asp Val Gly

305 310 315 320

Gly Asn Ala Thr Thr Asp Asp Leu Ile Asn Glu Ile Tyr Asn Lys Leu

325 330 335

Gly

<210> 51

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for site
directed mutagenesis

<400> 51

tttgctggtc ttaagttggc ataaagatca taaatttgtc

40

<210> 52

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for site
directed mutagenesis

<400> 52

agtttagccc tacgctcgcg attctctcag aagc

34

<210> 53

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for site
directed mutagenesis

<400> 53

aatgcaaagt ttagcgctac ttttgctatt c

31

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for site
directed mutagenesis

<400> 54

tgcaaagttt agcgctactc ttgctattct etc

33

<210> 55

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for site
directed mutagenesis

<400> 55

tccagcaatg tccggagcac taccgtgtac tg

32

<210> 56

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for site
directed mutagenesis

<400> 56

tcatacatc tctcgagcat catacttac

29

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 57

Asp Pro Ile Thr Asp Glu Ala Leu Asn Ala Ala Lys Ala

1. 5 10

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 58

Val Trp Ser Leu Asp Lys Ala Asn Val Leu Ala Ser Ser

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> *Neurospora crassa*

<400> 59

Lys Thr Lys Asp Leu Gly Gly

1 5

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 60

Val Pro Leu Pro Asp Glu Ala Leu Glu Ala Ser Lys Lys

1

5

10

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 61

Ile Trp Ser Leu Asp Lys Ala Asn Val Leu Ala Ser Ser

1

5

10

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 62

Arg Thr Gly Asp Leu Gly Gly

1

5

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 63

Val Ala Ile Ser Asp Ala Asp Asn Glu Lys Ala Leu Ala

1

5

10

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 64

Val Cys Ser Met Glu Lys Arg Asn Val Met Lys Ser Gly

1

5

10

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 65

Arg Thr Ala Asp Ile Met Ala

1

5

<210> 66

<211> 13

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 66

Asn Pro Leu Pro Glu Glu Thr Val Ala Ala Cys Lys Asn

1

5

10

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 67

Val Thr Ser Val Asp Lys Ala Asn Val Leu Glu Ser Ser

1

5

10

<210> 68

<211> 6

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 68

Arg Thr Arg Asp Leu Ala

1 5

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 69

Gln Pro Leu Pro Pro Ala Thr Val Glu Gly Cys Glu Gln

1 5 10

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 70

Val Thr Ser Ile Asp Lys Ala Asn Val Leu Gln Ser Ser

1 5 10

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 71

Arg Thr Gly Asp Leu Ala Arg

1

5

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 72

Glu Pro Phe Pro Glu Pro Thr Arg Lys Gly Val Glu Glu

1

5

10

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 73

Val Val Ser Val Asp Lys Ala Asn Val Leu Glu Val Gly

1

5

10

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 74

Glu Thr Pro Pro Pro Asp Leu Gly Gly

1

5

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> *Sulfolobus* sp.

<400> 75

Glu Ala Leu Pro Lys Asp Ser Leu Lys Ile Ile Asp Lys

1

5

10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> *Sulfolobus* sp.

<400> 76

Val Thr Cys Val His Lys Ala Asn Val Asn Arg Ile Thr

1

5

10

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> *Sulfolobus* sp.

<400> 77

Lys Ala Leu Thr Pro Asp Val Gly Gly

1

5

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 78

Thr Thr Ile Pro Asp Pro Ala Val Gln Ser Ile Lys Thr

1

5

10

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 79

Val Ser Ala Ile His Lys Ala Asn Ile Asn Gln Lys Thr

1

5

10

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 80

Glu Asn Arg Thr Gly Asp Leu Ala Gly

1

5

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 81

Trp Met Ile Pro Pro Glu Ala Lys Glu Ser Asn Asp Lys

1

5

10

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 82

Val Thr Ala Val His Lys Ala Asn Ile Asn Arg Met Ser

1

5

10

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 83

Asn Met His Thr Pro Asp Ile Gly Gly

1

5

<210> 84

<211> 13

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 84

Glu Trp Leu Pro Ala Glu Thr Leu Asp Val Ala Arg Glu

1

5

10

<210> 85

<211> 13

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 85

Val Thr Leu Val His Lys Gly Asn Ile Asn Lys Phe Thr

1

5

10

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 86

Arg Val Leu Thr Gly Asp Val Val Gly

1

5

<210> 87

<211> 13

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 87

Val Trp Leu Pro Ala Glu Thr Leu Asp Leu Ile Arg Glu

1

5

10

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 88

Val Thr Leu Val His Lys Gly Asn Ile Asn Lys Phe Thr

1

5

10

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 89

Val Val Thr Tyr Asp Phe Ala Arg

1

5

<210> 90

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
for site directed mutagenesis

<400> 90

ctagttattg ctcagcggt

19

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
for site directed mutagenesis

<400> 91

taatacgact cactataggg

20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
for site directed mutagenesis

<400> 92

gggctcgggc aagggtcgc

20

<210> 93

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligo

nucleotide for site directed mutagenesis

<400> 93

aggtccgggg tcgggtctc c

21

<210> 94

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:oligonucleotide
for site directed mutagenesis

<400> 94

cttgccacg ctcgtcacgt gcttcctg

28

<210> 95

<211> 32

<212> PRT

<213> Sulfolobus sp.

<400> 95

Val Ile Val Thr Glu Asn Val Tyr Gly Asp Ile Leu Ser Asp Glu Ala

1

5

10

15

Ser Gln Ile Ala Gly Ser Leu Gly Ile Ala Pro Ser Ala Asn Ile Gly

20

25

30

<210> 96

<211> 6

<212> PRT

<213> *Sulfolobus* sp.

<400> 96

Ala Leu Phe Glu Pro Val

1

5

<210> 97

<211> 32

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 97

Val Ile Val Thr Thr Asn Met Asn Gly Asp Ile Leu Ser Asp Leu Thr

1

5

10

15

Ser Gly Leu Ile Gly Gly Leu Gly Phe Ala Pro Ser Ala Asn Ile Gly

20

25

30

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> *Thermus thermophilus*

<400> 98

Ala Ile Phe Glu Ala Val

1 5

<210> 99

<211> 32

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 99

Val Leu Val Met Pro Asn Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Ser Asp Leu Cys

1 5 10 15

Ala Gly Leu Ile Gly Gly Leu Gly Val Thr Pro Ser Gly Asn Ile Gly

20 25 30

<210> 100

<211> 6

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 100

Ala Ile Phe Glu Ala Val

1

5

<210> 101

<211> 33

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 101

Val Ser Val Cys Pro Asn Leu Tyr Gly Asp Ile Leu Ser Asp Leu Asn

1

5

10

15

Ser Gly Leu Ser Ala Gly Ser Leu Gly Leu Thr Pro Ser Ala Asn Ile

20

25

30

Gly

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 102

Ser Ile Phe Glu Ala Val

1 5

<210> 103

<211> 32

<212> PRT

<213> *Caldococcus noboribetus*

<400> 103

Val Ile Val Thr Pro Asn Leu Asn Gly Asp Tyr Ile Ser Asp Glu Ala

1 5 10 15

Asn Ala Leu Val Gly Gly Ile Gly Met Ala Ala Gly Leu Asp Met Gly

20 25 30

<210> 104

<211> 6

<212> PRT

<213> *Caldococcus noboribetus*

<400> 104

Ala Val Ala Glu Pro Val

1

5

【図面の簡単な説明】

【図 1】

16S rRNAの比較による系統樹を示す。

【図 2】

種々の生物種由来のIPMDHおよびICDHのアミノ酸配列のマルチプルアラインメントを示す。

【図 3】

IPMDHおよびICDHの同時比較によって構築された系統樹を示す。

【図 4】

Sulforobus sp.7株の152番残基の進化を示す。

【図 5】

pE7-SB21の制限酵素地図を示す。pE7-SB21は発現ベクターpET21cのNdeI-EcoEI領域にleuB遺伝子を挿入して作製された。図中の記号は以下の制限酵素切断部位を表す：N:Nde I、Sm:Sma I、E:EcoR I、E₄₇:Eco47 III、B:Bgl II、Xb:Xba I、H:Hind III、Xh:Xho I、M:Mro I

【図 6】

スルフォロブスsp. leuB遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を示す。

【図 7】

スルフォロブスsp. leuB遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列（続き）。

【図 8】

abcd領域における変異導入の概略を示す。図中の記号は以下の制限酵素切断部位を表す：N:Nde I、Sm:Sma I、E:EcoR I、E₄₇:Eco47III、B:BglIII、X_b:Xba I、H:Hind III、Xh:XhoI、M:Mro I、Na:Nae I、Sa:Sal I

【図 9】

IPMDHおよびICDHのマルチプルアラインメントを示す。(ICDH)は各生物種のICDHアミノ酸配列を表し、表示がない配列はIPMDHを表す。N. Cra: *Neurospora cra*

ssa, S. Cer: *Saccharomyces cerevisiae*, A. tum: *Agrobacterium tumefaciens*, B. sub: *Bacillus subtilis*, E. Col: *Escherichia coli*, T. The: *Thermus thermophilus*, Sub sp.#7: *Sulfolobus stain #7*, Cs. Cer: *Saccharomyces cerevisiae* (ICDH)、CB. Tau: *Bos taurus* (ICDH)、CB. Sub: *Bacillus subtilis* (ICDH)、CE. Col: *Escherichia coli* (ICDH)。

【図 1 0】

Thermus thermophilus IPMDHの53番残基の進化を表す。

【図 1 1】

Thermus thermophilus IPMDHがクローニングされたプラスミドpET21cを鋳型とした変異導入手順を示す。

【図 1 2】

*Thermus thermophilus*野生型及び祖先型IPMDH活性の熱処理後の残存を示す。

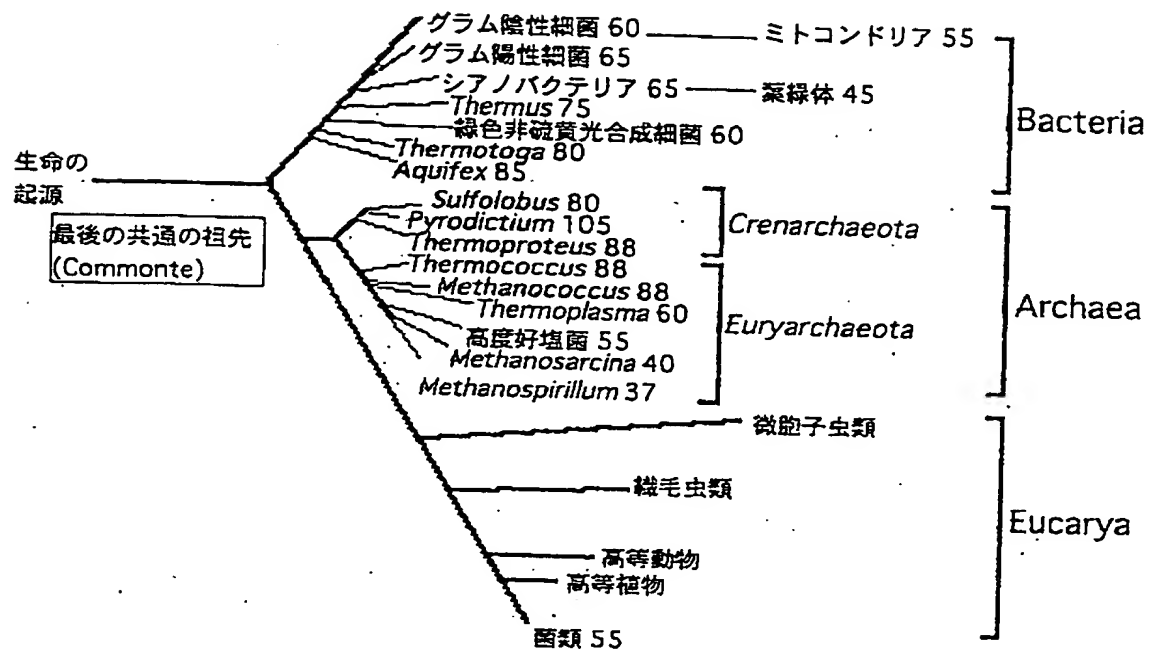
【図 1 3】

IPMDHおよびICDHのマルチプルアラインメントを示す。

【書類名】

図面

【図 1】



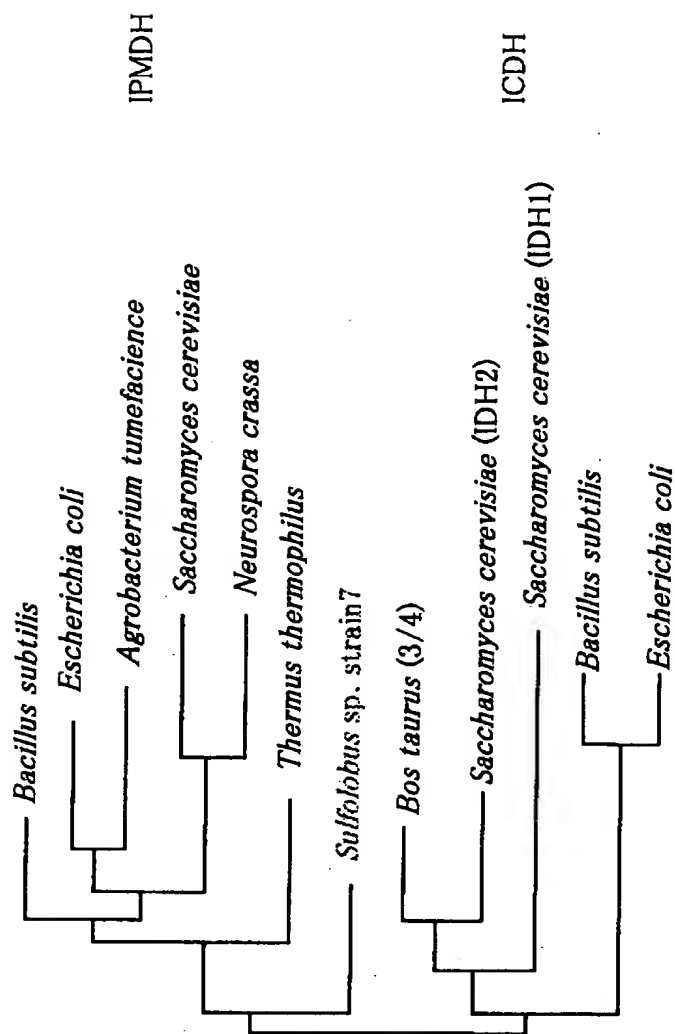
IPMDHおよびICDHの部分アミノ酸配列アラインメント

【図 2】

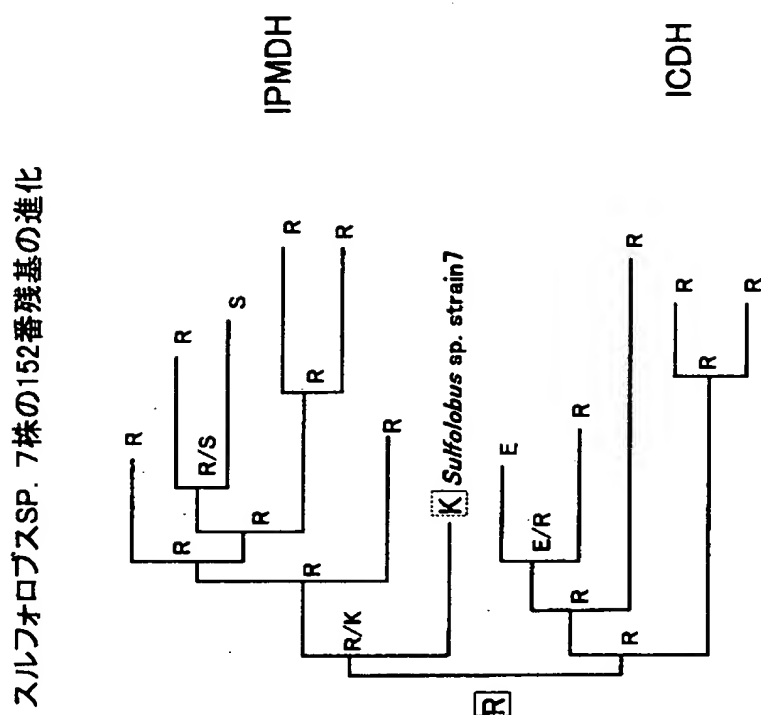
	89	97	149	157	256	263	280	285
IPMDH								
<i>Sulfolobus</i> sp. strain 7	YDMYANLRP	---	IAKVG-LNFA	---	VHGAAPDI	---	MMYERM	
<i>Thermus thermophilus</i>	QDLFANLRP	---	VARVA-FAAA	---	VHGSAPDI	---	MMLEHA	
<i>Bacillus subtilis</i>	LDLFANLRP	---	VIREG-FKMA	---	VHGSAPDI	---	MLLRTS	
<i>Escherichia coli</i>	EKLFSNLRP	---	IARIA-FESA	---	AGGSAPDI	---	LLLRYS	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LELFANLRP	---	IASVA-FELA	---	VHGSAPDI	---	MCLRYS	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LQLYANLRP	---	ITRMAAF-MA	---	CHGSAPDI	---	MMLKLS	
<i>Neurospora crassa</i>	LGTYGNLRP	---	IARLAGF-LA	---	IHGSAPDI	---	MMLRYS	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	FGLFANVRP	---	VIRYA-FEYA	---	VHGSAPDI	---	MMLNHM	
<i>Bos taurus</i> (3/4)	FDLYANVRP	---	IAEFA-FEYA	---	VHGTAPDI	---	MMLRHM	
<i>Bacillus subtilis</i>	LDLFVCLRP	---	LVRAA-IDYA	---	THGTAPKY	---	LLLEHL	
<i>Escherichia coli</i>	LDLYICLRP	---	LVRAA-IEYA	---	THGTAPKY	---	MMLRHM	
Ancestral residues	xDLxANLRP	---	IARxAFExA	---	VHGSAPDI	---	MMLxxx	
ICDH								

【図 3】

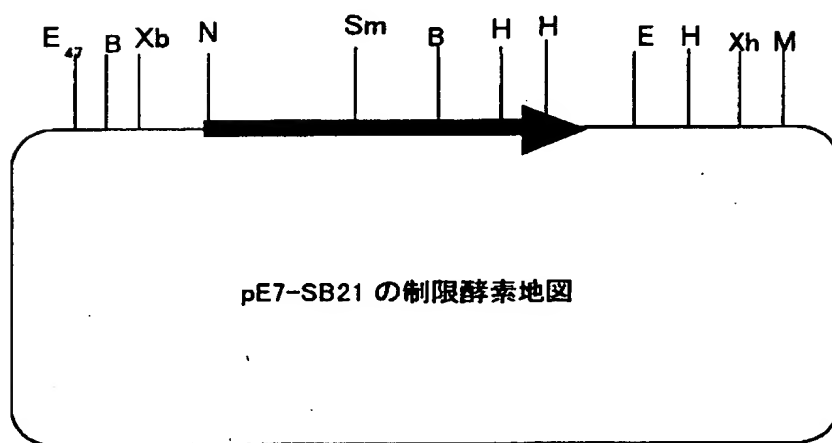
IPMDHおよびICDHの同時比較に基づく複合系統樹



【図4】



【図 5】



E₄₇: Eco47 III, B:Bgl II, Xb:Xba I, N:Nde I, Sm:Sma I, H:Hind III, E:EcoR I, Xh:Xho I, M:Mro I

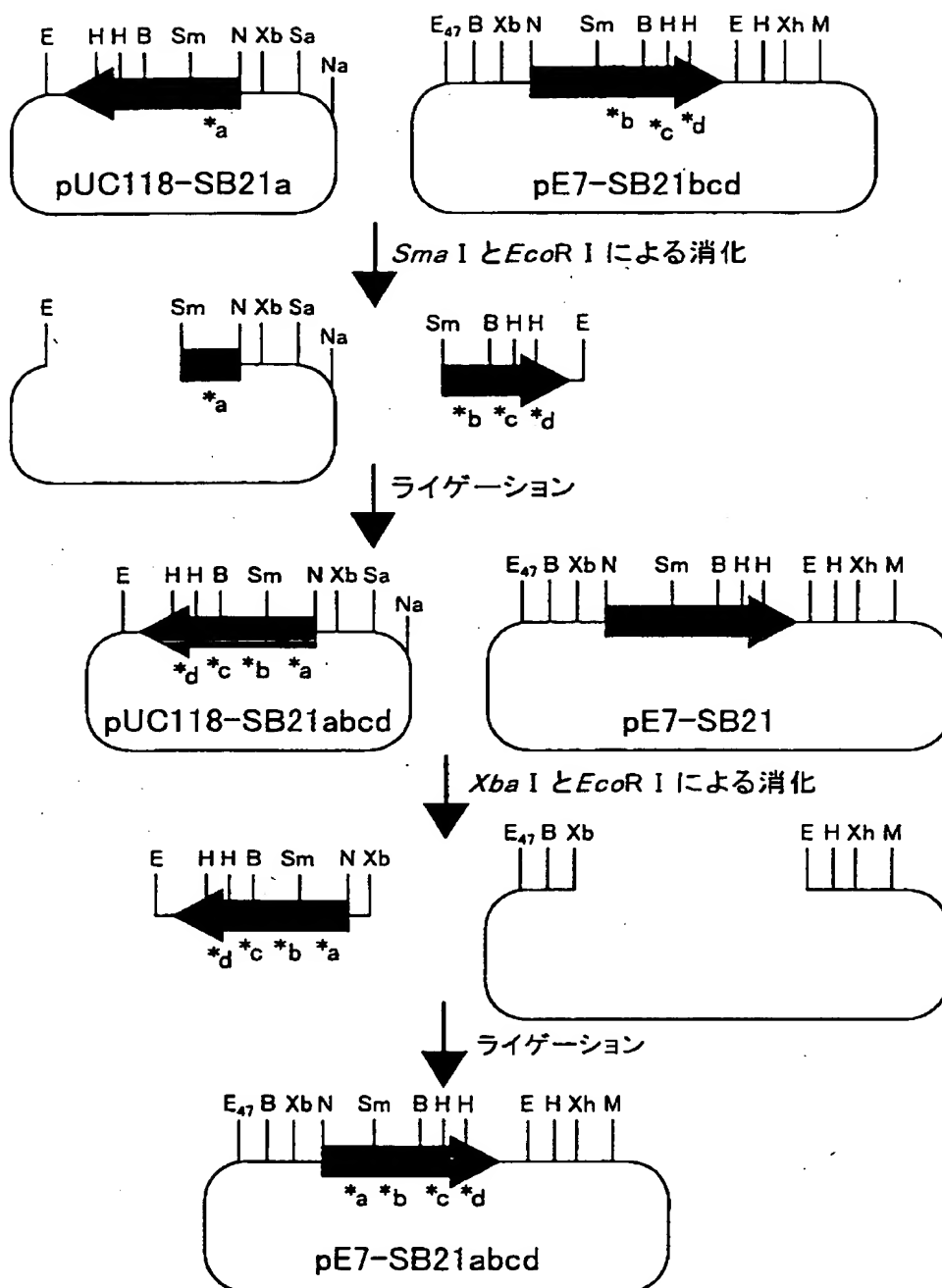
【図 6】

atg ggc ttt act gtt gct tta ata caa gga gat gga att gga cca gaa	48
Met Gly Phe Thr Val Ala Leu Ile Gln Gly Asp Gly Ile Gly Pro Glu	16
ata gta tct aaa tct aag aga ata tta gcc aaa ata aat gag ctt tat	96
Ile Val Ser Lys Ser Lys Arg Ile Leu Ala Lys Ile Asn Glu Leu Tyr	32
tct ttg cct atc gaa tat att gaa gta gaa gct ggt gat cgt gca ttg	144
Ser Leu Pro Ile Glu Tyr Ile Glu Val Glu Ala Gly Asp Arg Ala Leu	48
gca aga tat ggt gaa gca ttg cca aaa gat agc tta aaa atc att gat	192
Ala Arg Tyr Gly Glu Ala Leu Pro Lys Asp Ser Leu Lys Ile Ile Asp	64
aag gcc gat ata att ttg aaa ggt cca gta gga gaa tcc gct gca gac	240
Lys Ala Asp Ile Ile Leu Lys Gly Pro Val Gly Glu Ser Ala Ala Asp	80
プライマーP1 アニースリング領域	
gtt gtt gtc aag tta aga caa att tat gat atg tat gcc aat att aga	288
Val Val Val Lys Leu Arg Gln Ile Tyr Asp Met Tyr Ala Asn Ile Arg	96
cca gca aag tct atc ccg gga ata gat act aaa tat ggt aat gtt gat	336
Pro Ala Lys Ser Ile Pro Gly Ile Asp Thr Lys Tyr Gly Asn Val Asp	112
ata ctt ata gtg aga gaa aat act gag gat tta tac aaa ggt ttt gaa	384
Ile Leu Ile Val Arg Glu Asn Thr Glu Asp Leu Tyr Lys Gly Phe Glu	128
cat att gtt tct gat gga gta gcc gtt ggc atg aaa atc ata act aga	432
His Ile Val Ser Asp Gly Val Ala Val Gly Met Lys Ile Ile Thr Arg	144
プライマーP4 アニースリング領域	
ttt gct tct gag aga ata gca aaa gta ggg cta aac ttt gca tta aga	480
Phe Ala Ser Glu Arg Ile Ala Lys Val Gly Leu Asn Phe Ala Leu Arg	160
agg aga aag aaa gta act tgt gtt cat aag gct aac gta atg aga att	528
Arg Arg Lys Lys Val Thr Cys Val His Lys Ala Asn Val Met Arg Ile	176
act gat ggt tta ttc gct gaa gca tgc aga tct gta tta aaa gga aaa	576
Thr Asp Gly Leu Phe Ala Glu Ala Cys Arg Ser Val Leu Lys Gly Lys	192
gta gaa tat tca gaa atg tat gta gac gca gca gcg gct aat tta gta	624
Val Glu Tyr Ser Glu Met Tyr Val Asp Ala Ala Ala Ala Asn Leu Val	208

【図 7】

aga aat cct caa atg ttt gat gta att gta act gag aac gta tat gga	672
Arg Asn Pro Gln Met Phe Asp Val Ile Val Thr Glu Asn Val Tyr Gly	224
gac att tta agt gac gaa gct agt caa att gcg ggt agt tta ggt ata	720
Asp Ile Leu Ser Asp Glu Ala Ser Gln Ile Ala Gly Ser Leu Gly Ile	240
プライマー	
gca ccc tct gcg aat ata gga gat aaa aaa gct tta ttt gaa cca gta	768
Ala Pro Ser Ala Asn Ile Gly Asp Lys Lys Ala Leu Phe Glu Pro Val	256
P5 アニールリング領域	
cac ggt gca gcg ttt gac att gct gga aag aat ata ggt aat ccc act	816
His Gly Ala Ala Phe Asp Ile Ala Gly Lys Asn Ile Gly Asn Pro Thr	272
プライマーP6 アニールリング領域	
gca ttt tta ctt tct gla agt atg atg tat gaa aga atg tat gag cta	864
Ala Phe Leu Leu Ser Val Ser Met Met Tyr Glu Arg Met Tyr Glu Leu	288
tct aat gac gat aga tat ata aaa gct tca aga gct tta gaa aac gct	912
Ser Asn Asp Asp Arg Tyr Ile Lys Ala Ser Arg Ala Leu Glu Asn Ala	304
ata tac tta gtc tac aaa gag aga aaa gcg tta acc cca gat gta ggt	960
Ile Tyr Leu Val Tyr Lys Glu Arg Lys Ala Leu Thr Pro Asp Val Gly	320
ggt aat gcg aca act gat gac tta ata aat gaa att tat aat aag cta	1008
Gly Asn Ala Thr Thr Asp Asp Leu Ile Asn Glu Ile Tyr Asn Lys Leu	336
ggc taa	1014
Gly	

【図 8】

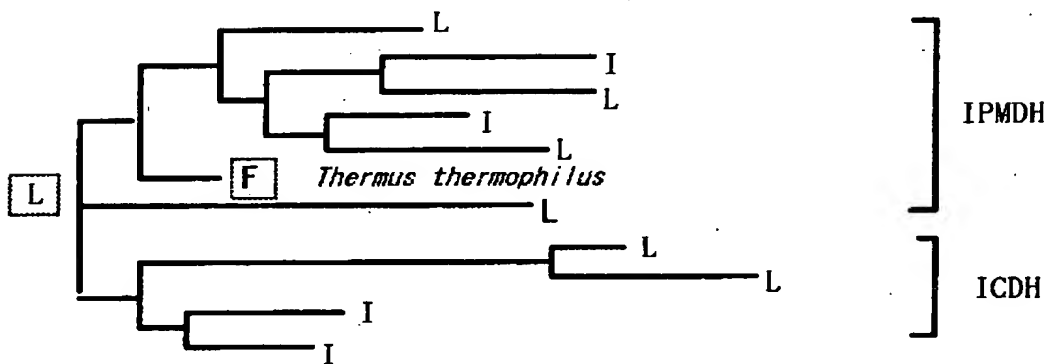


N; *Nde* I, Sm; *Sma* I, E; *EcoR* I, E₄₇; *Eco*47 III, B; *Bgl* II, Xb; *Xba* I
H; *Hind* III, Xh; *Xho* I, M; *Mro* I, Na; *Nae* I, Sa; *Sal* II

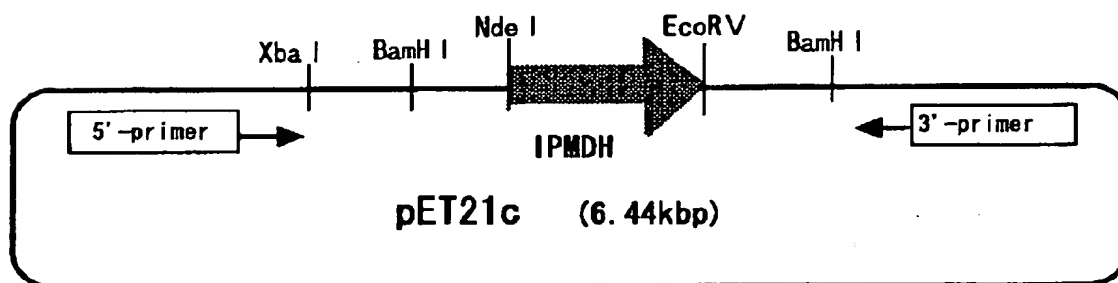
【図 9】

	51	180	321
N. Cra	DPITDEALNAAKA	VWSLDKANVLASS	--KTKDLGG ...
S. Cer	VPLPDEALEASKK	IWSLDKANVLASS	--RTGDLGG ...
A. Tum	VAISDADNEKALA	VCSMEKRNVMKSG	--RTADTMA ...
B. Sub	NPLPEETVAACKN	VTSDKANVLESS	--RTRDL-A ...
E. Col	QPLPPATVEGCEQ	VTSIDKANVLQSS	--RTGDIAR ...
T. The	EPFPEPTRKGVEE	VVSVDKANVLEVG	ETPPFDLGG ...
	↓ ← Phe53Leu	↓ ← Val181Thr	↓ ← Pro324Thr
	L	T	T
Sub sp. #7	EALPKDSLKIIDK	VTCVHKANVNRI	KALTPDVGG
Cs. Cer	TTIPDPAVQSIKT	VSAIHKANINQKT	ENRTGDLAG
CB. Tau	WMIPPEAKESNDK	VTAVHKANINRMS	NMHTPDIGG
CB. Sub	EWLPAETLDVARE	VTLVHKGNIKFT	RVLTGDVVG
CE. Col	VWLPAETLDLIRE	VTLVHKGNIKFT	-VVTYDFAR

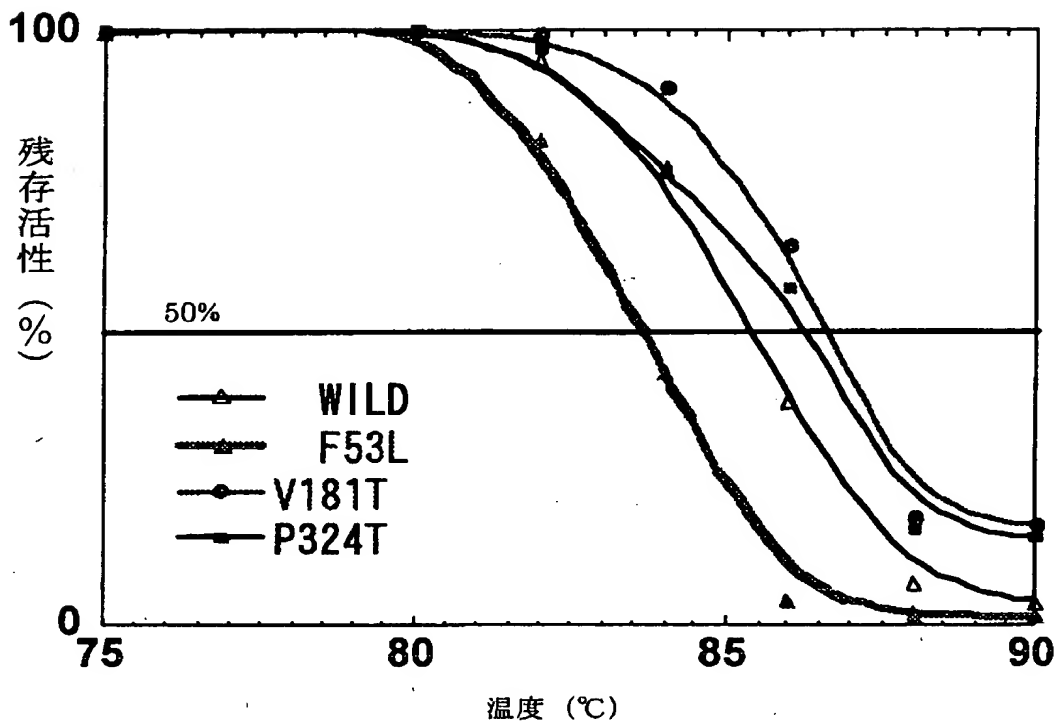
【図 10】



【図 11】



【図 1 2】



【図 13】

	αヘリックス	βシート	βシート
<i>Sulfolobus</i> sp. 7	315 VIVTENVYGDILSDEASQIAGS-LGIAPSANIGALFEPV	
<i>T. thermophilus</i>	231 VIVTTNMGDILSDLTSGLIGG-LGFAPSANIGAIFEAV	
<i>B. taurus</i>	247 VLVMPNLYGDILSDLCAGLIGG-LGVTPSGNIGAIFEAV	
<i>S. cerevisiae</i>	253 VSVCPNLYGDILSDNLNSGLSAGSLGLTPSANIGSIFEAV	
<i>C. noboribetus</i>	299 VIVTPNLNGDYISDEANALVGG-IGMAAGLDMGAVAEPV	

	IL	L PS	F
	Y309I/I310L	I320L A325P/G326S	A336F
	(N1)	(N2)	(N3)
			(N4)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質の耐熱性を改善する方法、および耐熱性の改善されたタンパク質およびそのタンパク質をコードする核酸、および、耐熱性の改善されたタンパク質を産生する宿主細胞を提供すること

【解決手段】 (i) 系統樹中の複数の生物種に由来する、進化的に互いに対応するタンパク質のアミノ酸配列を比較すること、

(ii) (i) で比較したアミノ酸配列に対応する、祖先型タンパク質のアミノ酸配列を推定すること、

(iii) (i) で比較したタンパク質の1つにおいて、そのアミノ酸配列中のアミノ酸残基を(ii)で推定した祖先型タンパク質中の対応する位置のアミノ酸残基と比較し、前記祖先型と異なるアミノ酸残基の1以上を前記祖先型タンパク質と同一のアミノ酸残基に置換する、ことを含む方法。

【選択図】 なし

特2001-164332

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社